

EP 0 470 437 (3)

A61K9/127

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets A61K9/127



Veröffentlichungsnummer: 0 470 437 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 91112377.6

(51) Int. Cl. 5: A61K 9/127

(22) Anmeldetag: 24.07.91

(20) Priorität: 06.08.90 DE 4024886
19.03.91 DE 4108902
10.07.91 DE 4122744

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.02.92 Patentblatt 92/07

(54) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: A. Nattermann & Cie. GmbH
Nattermannallee 1
W-5000 Köln 30(DE)

(72) Erfinder: Hager, Jörg
Hermann-Joseph-Schmitt-Strasse 48
W-5000 Köln 30(DE)
Erfinder: Dürr, Manfred Dr.
Hohe Strasse 14
W-5010 Bergheim-Glessen(DE)
Erfinder: Lünebach, Ernst Dr.
Magdalenenweg 3
W-5024 Ertstadt-Lechenich(DE)

(74) Vertreter: Döring, Wolfgang, Dr. Ing.
Mörkestrasse 18
W-4000 Düsseldorf 30(DE)

(56) Wasserhaltiges Liposomensystem.

(57) Es wird ein wässriges Liposomensystem, das ggf. neben einem nicht toxischen organischen Lösungsmittel mindestens ein Phospholipid aufweist, beschrieben. Hierbei enthält das Liposomensystem neben dem mindestens einen Phospholipid des weiteren mindestens einen Phospholipidischen Ladungsträger.

EP 0 470 437 A1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein wasserhaltiges Liposomensystem nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1 sowie ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Liposomensystems.

Phospholipidische Liposomensysteme sind für verschiedene Anwendungen bekannt. So werden diese Systeme beispielsweise im kosmetischen Bereich oder für die Herstellung von pharmazeutischen Produkten eingesetzt. Dabei sind die jeweiligen Wirkstoffe in den als Liposomen bezeichneten Kugeln (Vesikel) eingekapselt, wobei diese Liposome vorzugsweise in ihrem Inneren eine wäßrige Phase enthalten, in der der entsprechende Wirkstoff dann entsprechend gelöst, dispergiert oder emulgiert ist. Nach außen sind die Liposomen durch eine Lipiddoppelmembran begrenzt.

So beschreiben beispielsweise die EP A 03 09 519 und die EP A 03 15 467 Liposomensysteme, die den Wirkstoff Pentamidin einkapseln und die als entsprechende pharmazeutische Produkte verwendet werden.

Die bekannten Liposomensysteme weisen häufig den Nachteil auf, daß sie die Tendenz besitzen, schon nach kurzer Zeit einen unerwünschten Bodensatz auszubilden.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein wasserhaltiges phospholipidisches Liposomensystem zur Verfügung zu stellen, das eine besonders hohe Stabilität besitzt und somit nicht zur Ausbildung eines Bodensatzes neigt.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Liposomensystem mit dem kennzeichnenden Merkmal des Patentanspruchs 1 gelöst.

Das erfindungsgemäße wasserhaltige Liposomensystem weist neben dem mindestens einen Phospholipid des weiteren mindestens einen phospholipidischen Ladungsträger auf.

Das erfindungsgemäße Liposomensystem weist eine Reihe von Vorteilen auf. So konnte festgestellt werden, daß das erfindungsgemäße Liposomensystem auch bei einer extrem langen Lagerzeit von mehreren Monaten bis Jahren keine Tendenz zeigte, einen Bodensatz oder Ablagerungen an den Gefäßwänden auszubilden. Des weiteren besitzt das erfindungsgemäße Liposomensystem eine hohe Transparenz und ist nicht, wie bei den bekannten Liposomensystemen, milchig trüb. Dies wiederum führt dazu, daß bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem ohne Schwierigkeiten eine Prüfung auf Fremdpartikeln durchführbar ist, da es hierfür lediglich erforderlich ist, die entsprechende Liposomendispersionen im Durchsichtverfahren zu überprüfen. Auch ist es steril filtrierbar, so daß sich das erfindungsgemäße Liposomensystem insbesondere für eine pharmazeutische, kosmetische oder diabetische Anwendung eignet.

Die zuvor beschriebenen vorteilhaften Wirkungen des erfindungsgemäßen Liposomensystems werden darauf zurückgeführt, daß es offensichtlich aufgrund der Anwesenheit des negativen phospholipidischen Ladungsträgers zu einem synergistischen Effekt kommt.

Besonders gute Ergebnisse bezüglich der zuvor aufgeführten Vorteile weist eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposomensystems auf, das als phospholipidischen Ladungsträger mindestens ein Salz, vorzugsweise ein Natrium- und/oder ein Ammoniumsalz, von Phosphatidylglycerol und/oder dessen Derivaten enthält. Hierbei handelt es sich vorzugsweise um das entsprechende Salz von Dimyristoylphosphatidylglycerol und/oder Dipalmitoylphosphatidylglycerol.

Grundsätzlich kann man bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem das Phosphatidylglycerol, das bei den zuvor beschriebenen Ausführungsformen in Form eines entsprechenden Salzes vorliegt und somit den bevorzugten negativen phospholipidischen Ladungsträger bildet, aus jeder natürlichen Substanz, wie beispielsweise aus Ölsaaten, Raps, Sonnenblumen u. dgl., isolieren und dementsprechend ggf. nach einer Reinigung einsetzen. Besonders geeignet ist es jedoch, wenn man die zuvor genannten Salze des Phosphatidylglycerols bzw. der entsprechenden Derivate davon aus Sojabohnen isoliert, so daß vorzugsweise bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem als negativer Ladungsträger ein Soja-Phosphatidylglycerol-Alkalisalz, insbesondere Natrium- oder Kaliumsalz, bzw. ein Soja-Phosphatidylglycerolderivat-Alkalisalz, vorzugsweise Natrium- oder Kaliumsalz, eingesetzt wird.

Bezüglich der Massenverhältnisse des mindestens einen Phospholipids zu dem mindestens einen negativen phospholipidischen Ladungsträger ist festzuhalten, daß dieses Massenverhältnis zwischen 50:1 bis 400:1, vorzugsweise zwischen 100:1 bis 200:1, variiert. Hierbei konnte festgestellt werden, daß bereits die vorstehend kleinen Mengen des negativen Ladungsträgers ausreichen, um das hieraus erstellte phospholipidische Liposomensystem die vorstehend beschriebene Stabilität bei einer Lagerung sowie eine hohe Transparenz zu verleihen. Eine besonders lange Haltbarkeit sowie eine besonders hohe Verteilung der Liposomen weist eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposomensystems auf, das als Phospholipid Phosphatidylcholin enthält. Insbesondere dann, wenn es sich bei dem Phosphatidylcholin um hochreines Phosphatidylcholin handelt, d.h. um solches Phosphatidylcholin, das weniger als etwa 10 Gew.% Verunreinigungen aufweist, besitzt ein hieraus hergestelltes Liposomensystem, das vorzugsweise als negativen phospholipidischen Ladungsträger das zuvor beschriebene Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz enthält, die eingangs beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften. Hinzu kommt noch, daß ein derartiges

spezielles Liposomensystem mit wesentlich geringerem Aufwand und somit in etwa der halben Zeit durch Hochdruckspalthomogenisation oder Ultraschall auf einen gewünschten mittleren Partikeldurchmesser, der zwischen 50 nm und 180 nm, vorzugsweise zwischen 70 nm und 130 nm, liegt, homogen zerkleinert werden kann. Auch läßt sich ein derartig spezielles Liposomensystem ohne Problem steril filtrieren, wobei
 5 hierfür vorzugsweise 0,2 µm Filter eingesetzt werden.

Bezüglich der Phospholipidkonzentration bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem ist festzuhalten, daß diese zwischen 0,5 Gew.% und 20 Gew.% variiert.

Wie bereits eingangs beschrieben, kann auch das erfindungsgemäße Liposomensystem sowohl für pharmazeutische als auch für kosmetische Zwecke eingesetzt werden.

10 Wird das erfindungsgemäße Liposomensystem für pharmazeutische Zwecke verwendet, so bestehen zwei Möglichkeiten.

Hierbei sieht die erste Möglichkeit vor, daß das erfindungsgemäße Liposomensystem in Form eines Leer-Liposomensystems verwendet wird, d.h. das Liposomensystem als solches weist bereits eine pharmazeutische Wirksamkeit auf. Hier konnte festgestellt werden, daß ein derartiges Leer-Liposomensystem
 15 hervorragend zur Behandlung von Atherosklerose, erhöhten Blutfettwerten sowie Hepatopathien jeder Genese einsetzbar ist, wobei ein derartiges System vorzugsweise neben Wasser und ggf. Alkohol zwischen 5 Gew.% und 15 Gew.% einer Mischung von Phosphatidylcholin und negativem Ladungsträger in dem zuvor genannten Massenverhältnis enthält. Insbesondere wird ein derartiges pharmazeutisches Produkt dann bei seiner Anwendung injiziert.

20 Die zweite Möglichkeit sieht vor, daß in das erfindungsgemäße Liposomensystem ein Wirkstoff eingekapselt wird. Hier hat sich gezeigt, daß ein derartig eingekapselter Wirkstoff im Vergleich zu der bekannten Aufmachungsform eine verbesserte therapeutische Wirkung, besitzt, ohne daß hierdurch das Behandlungsziel beeinträchtigt wird. Dieser Effekt wird darauf zurückgeführt, daß die in dem Liposomensystem eingekapselten Wirkstoffe besonders gleichmäßig über einen längeren Zeitraum während der therapeutischen Anwendung abgegeben werden, so daß auch unerwünschte Nebenwirkungen nicht auftreten
 25 oder zumindestens erheblich reduziert sind.

Die Auswahl des jeweiligen Wirkstoffes richtet sich dann nach dem jeweiligen Anwendungsgebiet. So können beispielsweise in dem erfindungsgemäßen Liposomensystem Pentamidin, Pentamidin-Salze, insbesondere Pentamidin-Isethionat, und/oder Pentamidin-Dervate gelöst und/oder eingekapselt werden, so daß
 30 ein derartiges pharmazeutisches Produkt vorzugsweise zur parenteralen und insbesondere zur pulmonalen Behandlung von Pneumocystis-carinii-Pneumonie, der afrikanischen Schlafkrankheit oder von Kala-Azar eingesetzt wird.

Besonders geeignet ist es jedoch, wenn man den zuvor genannten Wirkstoff nicht von Anfang an bei der Herstellung des Liposomensystems einsetzt, sondern den Wirkstoff erst unmittelbar vor der Anwendung
 35 zugeibt. Dies kann dadurch geschehen, daß man ein wäßriges Liposomensystem mit dem Wirkstoff als Trockensubstanz vermischt oder ein getrocknetes Liposomensystem zunächst in Wasser dispergiert und dann die Vermischung mit dem Wirkstoff herbeiführt. Ein derartig hergestelltes pharmazeutisches Produkt weist dann eine hohe Transparenz auf. In bestimmten Fällen werden ähnliche Effekte erzielt, indem Leer-Liposomen-Präparationen mit dem Wirkstoff kombiniert werden, ohne daß dabei der Wirkstoff in den
 40 Liposomen eingekapselt wird.

Weist hingegen das erfindungsgemäße Liposomensystem als Wirkstoff Doxorubicin x HCl auf, so kann es als entsprechendes pharmazeutisches Produkt zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

Soll hingegen das erfindungsgemäße Liposomensystem zur Behandlung von Viruserkrankungen, insbesondere Viruserkrankungen der Haut, verwendet werden, so bietet es sich hier an, einen entsprechenden
 45 viruciden Wirkstoff, vorzugsweise Rosmarinsäure oder Dextransulfat, einzukapseln.

Weiterhin können in dem erfindungsgemäßen Liposomensystem auch die entsprechenden bekannten Wirkstoffe zur Behandlung von Krebs, Aids, Leber- oder Viruserkrankungen eingekapselt oder angelagert werden.

50 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des zuvor beschriebenen Liposomensystems.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposomensystems basiert auf der Grunderkenntnis, daß man zunächst das jeweils eingesetzte Phospholipid, insbesondere das zuvor beschriebene Phosphatidylcholin bzw. hochreine Phosphatidylcholin zusammen mit dem phospholipidischen
 55 Ladungsträger, insbesondere dem Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz, in einem organischen Lösungsmittel löst oder dispergiert. Anschließend engt man die Lösung bzw. Dispersion in und gibt hiernach eine entsprechende Menge Wasser zu, um so das entsprechende Liposomensystem auszubilden.

Vorzugsweise verwendet man bei dem zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren als Lö-

ungsmittel Ethanol, Propanol 1 und/oder Propanol 2.

Abhängig von dem jeweils eingesetzten nicht toxischen organischen Lösungsmittel und seiner Mischbarkeit bzw. Verträglichkeit mit Wasser engt man die anfangs hergestellte Lösung bzw. Dispersion auf unterschiedliche Restvolumina ein. Werden z.B. als nicht toxische organische Lösungsmittel die zuvor genannten Alkohole eingesetzt, so bietet es sich hier an, die entsprechende Lösung des Phospholipids mit dem negativen phospholipidischen Ladungsträger auf ein Restvolumen zwischen 3 Vol.% und 30 Vol.%, vorzugsweise 5 Vol.% bis 10 Vol.%, einzuengen. Bei solchen organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser nicht mischbar sind, empfiehlt es sich, bis zur Trocknen einzuengen.

Um bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Liposomensystem herzustellen, das sich durch besonders gleichmäßige, gezielt eingestellte mittlere Liposomendurchmesser auszeichnet, bietet es sich an, nach der Zugabe des Wassers das hierbei entstehende Liposomensystem einer Hochdruckspalthomogenisation oder einer Ultraschallbehandlung zu unterwerfen. Vorzugsweise werden diese Behandlungen solange durchgeführt, bis die dabei gebildeten Liposome einen mittleren Durchmesser zwischen 50 nm und 180 nm aufweisen.

Zusätzlich hierzu kann man hiernach noch das so behandelte Liposomensystem über einen 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Die so hergestellten Liposomensysteme können dann entweder direkt anwendungsfertig in entsprechende Ampullen abgefüllt werden oder nach Zugabe geeigneter Hilfsstoffe, insbesondere Kohlehydrate, schonend getrocknet, insbesondere gefriergetrocknet, werden, so daß ein pulverartiges Liposomensystem entsteht, das durch Zugabe einer geeigneten Menge Wasser wieder die dann anwendungsbereiten erwünschten Vesikel ausbilden, ohne daß hierbei ein aufwendiges Rühren oder sonstiges Vermischen erforderlich ist.

Um die Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposomensystems, das eine der zuvor genannten Wirkstoffe aufweist, herzustellen, bestehen wiederum zwei Möglichkeiten.

So sieht die erste Möglichkeit vor, daß man den Wirkstoff zusammen mit dem Phospholipid und dem phospholipidischen Ladungsträger direkt zu Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens in das organische Lösungsmittel zugibt. Eine Abwandlung dieser Verfahrensvariante sieht vor, daß man das eingesetzte Phospholipid mit dem in einem nicht wäßrigen Lösungsmittel gelösten, dispergierten bzw. emulgierten Wirkstoff belädt, und dann nach schonender Trocknung das so beladene Phospholipid zusammen mit dem phospholipidischen Ladungsträger in einem organischen Lösungsmittel, das ggf. von dem ersten Lösungsmittel unterschiedlich ist, löst. Anschließend wird das organische Lösungsmittel, wie vorstehend beschrieben, eingeeengt und hiernach das Wasser unter Ausbildung des Wirkstoff-Liposomensystem zugegeben, wobei der Wirkstoff dann eingekapselt sein kann. Diese Verfahrensweise bietet sich insbesondere für solche Fälle an, bei denen der Wirkstoff bezüglich seiner Lagerung stabil ist.

Die zweite Möglichkeit, die insbesondere dann bevorzugt wird, wenn der Wirkstoff nicht in dem zuerst eingesetzten organischen Lösungsmittel, sondern in Wasser besser löslich ist, sieht vor, daß man zunächst in der vorstehend beschriebenen Weise das wäßrige Liposomensystem herstellt, wobei man dann zusammen mit dem Wasser den Wirkstoff zugibt.

Eine Abwandlung der zuvor beschriebenen Verfahrensweise, die insbesondere dann angewendet wird, wenn der Wirkstoff nur eine begrenzte Haltbarkeit besitzt, geht von einem pulverförmigen getrockneten Liposomensystem aus. Hierbei wird bei der Redispersierung zusammen mit dem dabei eingesetzten Wasser der Wirkstoff zugesetzt, so daß somit erst unmittelbar vor der Anwendung eines derartigen Produktes der Wirkstoff mit dem Liposomensystem in Kontakt kommt.

Um unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen, wird das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise unter Schutzgas (Inertgas) durchgeführt.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen angegeben.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung eines Leer-Liposomensystems

99,5 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 0,5 g Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz (PG) werden in 500 ml Ethanol DAB 9 gelöst und anschließend unter Vakuum zur Trockne gebracht. Das erhaltene Phospholipidgemisch wurde unter Rühren und Inertgas in Wasser für Injektionszwecke ad 1000 ml dispergiert und danach mittels Hochdruckspalthomogenisator in fünf Umläufen auf einen mittleren Partikeldurchmesser von < 100 nm gebracht. Das entstandene Liposo-

mensystem wurde anschließend unter sterilen Bedingungen über ein 0,2 µm Filter filtriert und unter Inertbegasung in 10,0 ml Ampullen abgefüllt. Das nach Beispiel 1 hergestellte Phosphatidylcholin/Soja-PG-Natriumsystem Liposomensystem wies folgende Eigenschaften auf:

5	Phospholipidgehalt:	10% (m/V)
	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH:	6,1
10	Viskosität:	2,6 mPa.s
	osmotischer Druck:	0,49 (% NaCl)
	Transmission (660 nm):	75%
	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	75 nm
	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
15	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht Anforderungen des DAB 9
	elektronenmikroskopische Charakterisierung (Kryofixierung):	40-100 nm unilamellare Liposomen, selten bilamellare Liposomen

20 Aufgrund seiner Zusammensetzung kann dieses Produkt in folgenden Anwendungsgebieten verwendet werden: Atherosklerose, erhöhte Blutfettwerte, Hepatopathien jeder Genese.

Beispiel 2

25 500 g Phospholipidmischung, bestehend aus 497,5 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 2,5 g Soja-PG-Natriumsalz, hergestellt nach Beispiel 1, wurden in 6,5 l Wasser für Injektionszwecke unter Rühren und Inertgas dispergiert. Danach wurde mit Wasser für Injektionszwecke auf 8,0 l aufgefüllt. In einem separaten Ansatzgefäß wurden 2 kg Maltose in 1,5 l Wasser für Injektionszwecke unter Erwärmen auf 70° gelöst. Durch mehrere Umläufen in einem Hochdruckspalthomogenisator (APV Gaulin, Typ LAB 60) wurde das Phospholipidsystem auf einen mittleren Partikeldurchmesser von 56 nm gebracht, mit der Maltoselösung unter Rühren und Inertgas gemischt, mit Wasser für Injektionszwecke auf 10,0 l aufgefüllt, sterilfiltriert, unter aseptischen Bedingungen abgefüllt und gefriergetrocknet. Das nach der Gefriertrocknung entstandene Lyophilisat wies folgende Merkmale auf:

35	Aussehen:	kristallines, schwach-gelbes Trockenpulver
	Gehalt an Restfeuchte nach Karl Fischer:	< 0,7%
	Gehalt an Phospholipiden:	500 mg/Vial
40	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität nach DAB 9
	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht den Anforderungen des DAB 9

Nach Redispergierung des Lyophilisates mit 8,3 ml Wasser für Injektionszwecke erhielt man ein Liposomensystem mit folgenden Eigenschaften:

45	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH-Wert:	6,5
	Viskosität:	2,7 mPa.s
50	Transmission (660 nm):	72%
	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuungsmethode):	60 nm

Das nach Beispiel 1 gefertigte Phospholipid-Liposomensystem und das nach Beispiel 2 gefertigte Lyophilisat kann für folgende Anwendungszwecke eingesetzt werden: Atherosklerose, erhöhte Blutfettwerte, Hepatopathien jeder Genese. Gegenüber des in Beispiel 1 gefertigten wässrigen Liposomensystems hat das nach Beispiel 2 gefertigte Lyophilisat den Vorteil einer noch größeren Stabilität.

Die nach Beispiel 1 hergestellte Phospholipidmischung, bestehend aus Phosphatidylcholin und Soja-PG-Natriumsalz, kann sowohl zur Herstellung von unbeladenen, sterilisierbaren Phosphatidylcholin-Liposomen-

systemen (Beispiel 1 + 2) als auch für die Herstellung von beladenen sterilen Liposomensystemen (Beispiel 3-5) verwendet werden.

Beispiel 3

10 g des erfindungsgemäßen Phospholipidgemisches wurden entsprechend Beispiel 1 gemeinsam mit 0.1 g Propidiumjodid (DNA-Marker) in Ethanol gelöst und nach Trocknung unter Vakuum, Inertgas und Kühlung in 100 ml Wasser für Injektionszwecke dispergiert. Danach wurde ebenfalls unter Inertbegasung und Kühlung eine Ultraschallbehandlung durchgeführt bis ein mittlerer Partikeldurchmesser der Liposomen von 80 nm (Laserlichtstreuung) erreicht wird. Das Liposomensystem wurde danach über ein 0.2 µm Filter sterilfiltriert und unter Inertbegasung zur Hälfte in braune 1.0 ml Ampullen abgefüllt. In dem sterilen, mit Propidiumjodid beladenen Liposomensystem wurde mittels eines Dialyseverfahrens (Dianorm[®]-Gerät, Zellosetriacetatmembran NMGT 20000) der Anteil an liposomalgebundenem Propidiumjodid ermittelt. Danach betrug der liposomalgebundene Propidiumjodidanteil 29%. In der 2. sterilfiltrierten Hälfte wurde der Anteil nicht liposomalgebundenen Propidiumjodids mittels Ultrafiltration über eine Zellosetriacetatmembran NMGT 20000 abgetrennt, die Liposomendispersion nochmals über 0.2 µm sterilfiltriert und zu 1.0 ml unter Inertbegasung in braune Ampullen abgefüllt. Die somit erhaltene Liposomendispersion wies folgende Eigenschaften auf:

Phospholipidgehalt:	100 mg/ml
Propidiumjodidgehalt:	0.285 mg/ml
pH-Wert:	7.2
Viskosität:	1.7 mPa.s
mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	129 nm

Beispiel 4

18.4 g der in Beispiel 1 beschriebenen Phospholipidmischung wurden gemeinsam mit 0.92 g Chinolingelb in Ethanol gelöst, unter Vakuum zur Trockne gebracht, mit Wasser für Injektionszwecke ad 200 ml dispergiert und danach unter Kühlung ultraschallbehandelt. Das erhaltene Liposomensystem wurde anschließend sterilfiltriert und unter aseptischen Bedingungen in Injektionsflaschen zu 5.0 ml abgefüllt. Die sterilfiltrierte Liposomendispersion wies folgende Eigenschaften auf:

Aussehen:	transparente, opalisierende gelbe Flüssigkeit
pH-Wert:	6.4
mittl. Partikeldurchmesser (Laserstreulichtmethode):	75 nm
Transmission (660 nm):	33 %
Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
Chinolingelb, liposomalgebunden:	1.38 mg/ml
Chinolingelb, nicht liposomalgebunden:	3.2 mg/ml

Zur Bestimmung des Anteils an liposomalgebundenem Chinolingelb wurde mittels Ultrafiltration über eine Zellosetriacetatmembran NMGT 20000 der nicht liposomalgebundenen Chinolingelbanteil abgetrennt und photometrisch in der Liposomendispersion und im Filtrat der Anteil Chinolingelb bestimmt.

Die entsprechend Beispiel 2 in ein steriles Trockenpulver überführte erfindungsgemäße Phospholipidmischung eignet sich auch zur exportierten (ready to use) Herstellung von mit aktiven wasserlöslichen Substanzen beladenen Liposomen.

Beispiel 5

Steriles Trockenpulver, entsprechend 500 mg Phospholipidmischung beschrieben in Beispiel 1, und 2000 mg Trägerstoff wurden mit 5.0 ml Doxorubicin HCl-Lösung (10.0 mg Doxorubicin HCl) dispergiert. Das entstehende und mit Doxorubicin HCl beladene Liposomen-Redispergat (6.8 ml) wies einen Gehalt an Phospholipididen von 73.5 mg/ml und einen GesamtDoxorubicin HCl Gehalt von 0.735 mg/ml auf. Der Anteil an liposomalgebundenem Doxorubicin HCl wurde mit 0.58 mg/ml ermittelt und entspricht einer Einschlußra-

Patentansprüche

1. Wäßriges Liposomensystem, das ggf. neben einem nicht toxischen organischen Lösungsmittel mindestens ein Phospholipid aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß das Liposomensystem neben dem Phospholipid des weiteren mindestens einen phospholipidischen Ladungsträger umfaßt.
2. Liposomensystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als phospholipidischen Ladungsträger mindestens ein Salz, vorzugsweise Natrium- und/oder Ammoniumsalz, von Phosphatidylglycerol und/oder dessen Derivaten aufweist.
3. Liposomensystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Ladungsträger das Salz von Dimyristoylphosphatidylglycerol und/oder Dipalmitoylphosphatidylglycerol aufweist.
4. Liposomensystem nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Phosphatidylglycerol ein Soja-Phosphatidylglycerol ist.
5. Liposomensystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es das Phospholipid zu dem phospholipidischen Ladungsträger in einem Massenverhältnis von 50:1 bis 400:1, vorzugsweise von 100:1 bis 200:1, aufweist.
6. Liposomensystem nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zwischen 0,5 Gew.% und 20 Gew.% Phospholipid enthält.
7. Liposomensystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Phospholipid Phosphatidylcholin enthält.
8. Liposomensystem nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Phosphatidylcholin ein hochreines Phosphatidylcholin ist und weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen aufweist.
9. Liposomensystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine pharmazeutisch wirksame Substanz beinhaltet.
10. Liposomensystem nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame Substanz ein Wirkstoff zur Behandlung von Krebs, Aids, Leber-, Viruserkrankungen oder Pneumocystis-carinii-Pneumonie ist.
11. Verfahren zur Herstellung eines Liposomensystems nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst das Phospholipid zusammen mit dem phospholipidischen Ladungsträger in einem organischen Lösungsmittel löst oder dispergiert, anschließend die Lösung bzw. Dispersion einengt und hiernach Wasser unter Ausbildung des Liposomensystems zugibt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als organisches Lösungsmittel Ethanol, Propanol 1 und/oder Propanol 2 verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lösung bzw. Dispersion auf ein Restvolumen an Lösungsmittel von 0 Vol.% bis 30 Vol.%, vorzugsweise 5 Vol.% bis 10 Vol.%, einengt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Zugabe des Wassers das hierbei entstehende Liposomensystem einer Hochdruckspalthomogenisation oder einer Ultraschallbehandlung unterwirft.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man die Hochdruckspalthomogenisation bzw. die Ultraschallbehandlung solange durchführt, bis die dabei gebildeten Liposome einen mittleren Durchmesser zwischen 50 nm und 180 nm aufweisen.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man das Liposomensystem über einen 0,2 µm Filter filtriert.

te von ca. 78%.

Die Ermittlung des liposomale gebundenen Doxorubicin HCl Anteils erfolgte nach der Dialysemethode mittels Liposomaten, Einsatz 5,0 ml, Dauer 5 Std.

5 Beispiel 6

Herstellung eines Leer-Liposomensystems

100 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 0,502 g Soja-
 10 Phosphatidylglycerol-Natriumsalz (PG) werden in 500 ml Ethanol DAB 9 gelöst und anschließend unter
 Vakuum auf einen Trockensubstanzgehalt von 92 Gew.% eingestellt. Das erhaltene Phospholipidgemisch,
 bestehend aus 91,54 Gew.% Phosphatidylcholin, 0,46 Gew.% Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz, 6
 Gew.% Ethanol und 2 Gew.% Wasser, wurde unter Rühren und Inertgas in Wasser für Injektionszwecke ad
 1000 ml dispergiert und danach mittels Hochdruckspalthomogenisator in fünf Umläufen auf einen mittleren
 15 Partikeldurchmesser von < 100 nm gebracht. Das entstandene Liposomensystem wurde anschließend unter
 sterilen Bedingungen über ein 0,2 µm Filter filtriert und unter Inertbegasung in 10,0 ml Ampullen abgefüllt.
 Das nach Beispiel 6 hergestellte Phosphatidylcholin/Soja-PG-Natriumsystem Liposomensystem wies folgen-
 de Eigenschaften auf:

20	Phosphatidylcholingehalt:	10% (m/V)
	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH:	6,1
	Viskosität:	2,6 mPa.s
25	osmotischer Druck:	0,49 (% NaCl)
	Transmission (660 nm):	75%
	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	75 nm
	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht den Anforderungen des DAB 9

30

Aufgrund seiner Zusammensetzung kann dieses Produkt in folgenden Anwendungsgebieten verwendet werden: Atherosklerose, erhöhte Blutfettwerte, Hepatopathien jeder Genese.

Beispiel 7

35

Herstellung eines Leer-Liposomensystems

100 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 0,502 g Soja-
 Phosphatidylglycerol-Natriumsalz (PG) werden in 500 ml Ethanol DAB 9 gelöst und anschließend unter
 40 Vakuum auf einen Trockensubstanzgehalt von 92 Gew.% eingestellt. Das erhaltene Phospholipidgemisch,
 bestehend aus 91,54 Gew.% Phosphatidylcholin, 0,46 Gew.% Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz, 6
 Gew.% Ethanol und 2 Gew.% Wasser, wurde unter Rühren und Inertgas in Wasser für Injektionszwecke ad
 8333 ml dispergiert und danach mittels Hochdruckspalthomogenisator bei 500 bar in fünf Umläufen auf
 einen mittleren Partikeldurchmesser von < 100 nm gebracht. Das entstandene Liposomensystem wurde
 45 anschließend unter sterilen Bedingungen über ein 0,2 µm Filter filtriert und unter Inertbegasung in 10,0 ml
 Ampullen abgefüllt. Das nach Beispiel 7 hergestellte Phosphatidylcholin/Soja-PG-Natriumsystem Liposo-
 mensystem wies folgende Eigenschaften auf:

50	Phosphatidylcholingehalt:	1,2% (m/V)
	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH:	6,19
	Viskosität:	1,4 mPa.s
	Transmission (660 nm):	82%
55	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	58 nm
	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht den Anforderungen des DAB 9



Europäisches
Pat ntmnt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 11 2377

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	US-A-4 744 989 (PAYNE ET AL.) - - -	1,5-11,18	A 61 K 9/127
X Y	US-A-4 744 989 (* Spalte 12, Zeile 36 - Spalte 13, Zeile 9 *) - - -	1,5-11,18 2-4, 12-17,19	
Y	EP-A-0 274 174 (YISSUM RESEARCH AND DEVELOPMENTCOMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF J) * Seite 15 - Seite 16; Beispiel 1 ** - - -	2-4,13,19	
X	US-A-4 348 384 (HORIKOSHI ET AL.) * Spalte 8 - Spalte 9; Beispiel 6 ** - - -	1	
X	EP-A-0 331 635 (THE BOARD OF REGENTS UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) - - -	1,2	
Y	DE-A-3 301 951 (A. NATTERMANN & CIE GMBH) * Seite 11 - Seite 14 ** - - -	12,14-17, 19,12, 14-17,19	
D.A	EP-A-0 315 467 (LYPHOMED, INC) - - - - -	10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			A 61 K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
Den Haag		14 November 91	BENZ K.F.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument S: Mitglied der gleichen Patentfamilie Ü: übereinstimmendes Dokument			

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man das durch die Zugabe des Wassers gebildete Liposomensystem nach Zugabe eines geeigneten Hilfsstoffes, insbesondere eines Kohlehydrates, schonend trocknet, insbesondere gefriertrocknet.
- 5 18. Verfahren zur Herstellung eines mit einem Wirkstoff versehenen Liposomensystems nach einem der Ansprüche 9 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man den Wirkstoff zusammen mit dem Phospholipid und dem phospholipidischen Ladungsträger in dem organischen Lösungsmittel löst, emulgiert oder dispergiert.
- 10 19. Verfahren zur Herstellung eines mit einem Wirkstoff versehenen Liposomensystems nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man das getrocknete Liposomensystem in Wasser, dem mindestens eine pharmazeutisch wirksame Substanz zugesetzt ist, aufnimmt.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 0 470 437 (3)

A61K9/127

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

A61K9/127

Veröffentlichungsnummer: 0 470 437 A1

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 91112377.6

(51) Int. Cl. 5: A61K 9/127

(22) Anmeldetag: 24.07.91

(20) Priorität: 06.08.90 DE 4024886
19.03.91 DE 4108902
10.07.91 DE 4122744

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.02.92 Patentblatt 92/07

(54) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: A. Nattermann & Cie. GmbH
Nattermannallee 1
W-5000 Köln 30(DE)

(72) Erfinder: Hager, Jörg
Hermann-Joseph-Schmitt-Strasse 48
W-5000 Köln 30(DE)
Erfinder: Dürr, Manfred Dr.
Hohe Strasse 14
W-5010 Bergheim-Glessen(DE)
Erfinder: Lünebach, Ernst Dr.
Magdalenenweg 3
W-5024 Ertstadt-Lechenich(DE)

(74) Vertreter: Döring, Wolfgang, Dr. Ing.
Mörkestrasse 18
W-4000 Düsseldorf 30(DE)

(54) Wasserhaltiges Liposomensystem.

(57) Es wird ein wässriges Liposomensystem, das ggf. neben einem nicht toxischen organischen Lösungsmittel mindestens ein Phospholipid aufweist, beschrieben. Hierbei enthält das Liposomensystem neben dem mindestens einen Phospholipid des weiteren mindestens einen Phospholipidischen Ladungsträger.

EP 0 470 437 A1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein wasserhaltiges Liposomensystem nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1 sowie ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Liposomensystems.

Phospholipidische Liposomensysteme sind für verschieden Anwendungen bekannt. So werden diese Systeme beispielsweise im kosmetischen Bereich oder für die Herstellung von pharmazeutischen Produkten eingesetzt. Dabei sind die jeweiligen Wirkstoffe in den als Liposomen bezeichneten Kugeln (Vesikel) eingekapselt, wobei diese Liposome vorzugsweise in ihrem Inneren eine wäßrige Phase enthalten, in der der entsprechende Wirkstoff dann entsprechend gelöst, dispergiert oder emulgiert ist. Nach außen sind die Liposomen durch eine Lipiddoppelmembran begrenzt.

So beschreiben beispielsweise die EP A 03 09 519 und die EP A 03 15 467 Liposomensysteme, die den Wirkstoff Pentamidin einkapseln und die als entsprechende pharmazeutische Produkte verwendet werden.

Die bekannten Liposomensysteme weisen häufig den Nachteil auf, daß sie die Tendenz besitzen, schon nach kurzer Zeit einen unerwünschten Bodensatz auszubilden.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein wasserhaltiges phospholipidisches Liposomensystem zur Verfügung zu stellen, das eine besonders hohe Stabilität besitzt und somit nicht zur Ausbildung eines Bodensatzes neigt.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Liposomensystem mit dem kennzeichnenden Merkmal des Patentanspruchs 1 gelöst.

Das erfindungsgemäße wasserhaltige Liposomensystem weist neben dem mindestens einen Phospholipid des weiteren mindestens einen phospholipidischen Ladungsträger auf.

Das erfindungsgemäße Liposomensystem weist eine Reihe von Vorteilen auf. So konnte festgestellt werden, daß das erfindungsgemäße Liposomensystem auch bei einer extrem langen Lagerzeit von mehreren Monaten bis Jahren keine Tendenz zeigte, einen Bodensatz oder Ablagerungen an den Gefäßwandungen auszubilden. Des weiteren besitzt das erfindungsgemäße Liposomensystem eine hohe Transparenz und ist nicht, wie bei den bekannten Liposomensystemen, milchig trüb. Dies wiederum führt dazu, daß bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem ohne Schwierigkeiten eine Prüfung auf Fremdpartikeln durchführbar ist, da es hierfür lediglich erforderlich ist, die entsprechende Liposomendispersionen im Durchsichtverfahren zu überprüfen. Auch ist es steril filtrierbar, so daß sich das erfindungsgemäße Liposomensystem insbesondere für eine pharmazeutische, kosmetische oder diabetische Anwendung eignet.

Die zuvor beschriebenen vorteilhaften Wirkungen des erfindungsgemäßen Liposomensystems werden darauf zurückgeführt, daß es offensichtlich aufgrund der Anwesenheit des negativen phospholipidischen Ladungsträgers zu einem synergistischen Effekt kommt.

Besonders gute Ergebnisse bezüglich der zuvor aufgeführten Vorteile weist eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposomensystems auf, das als phospholipidischen Ladungsträger mindestens ein Salz, vorzugsweise ein Natrium- und/oder ein Ammoniumsalz, von Phosphatidylglycerol und/oder dessen Derivaten enthält. Hierbei handelt es sich vorzugsweise um das entsprechende Salz von Dimyristoylphosphatidylglycerol und/oder Dipalmitoylphosphatidylglycerol.

Grundsätzlich kann man bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem das Phosphatidylglycerol, das bei den zuvor beschriebenen Ausführungsformen in Form eines entsprechenden Salzes vorliegt und somit den bevorzugten negativen phospholipidischen Ladungsträger bildet, aus jeder natürlichen Substanz, wie beispielsweise aus Ölsaaten, Raps, Sonnenblumen u. dgl., isolieren und dementsprechend ggf. nach einer Reinigung einsetzen. Besonders geeignet ist es jedoch, wenn man die zuvor genannten Salze des Phosphatidylglycerols bzw. der entsprechenden Derivate davon aus Sojabohnen isoliert, so daß vorzugsweise bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem als negativer Ladungsträger ein Soja-Phosphatidylglycerol-Alkalisalz, insbesondere Natrium- oder Kaliumsalz, bzw. ein Soja-Phosphatidylglycerolderivat-Alkalisalz, vorzugsweise Natrium- oder Kaliumsalz, eingesetzt wird.

Bezüglich der Massenverhältnisse des mindestens einen Phospholipids zu dem mindestens einen negativen phospholipidischen Ladungsträger ist festzuhalten, daß dieses Massenverhältnis zwischen 50:1 bis 400:1, vorzugsweise zwischen 100:1 bis 200:1, variiert. Hierbei konnte festgestellt werden, daß bereits die vorstehend kleinen Mengen des negativen Ladungsträgers ausreichen, um das hieraus erstellte phospholipidische Liposomensystem die vorstehend beschriebene Stabilität bei einer Lagerung sowie eine hohe Transparenz zu verleihen. Eine besonders lange Haltbarkeit sowie eine besonders hohe Verteilung der Liposomen weist eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposomensystems auf, das als Phospholipid Phosphatidylcholin enthält. Insbesondere dann, wenn es sich bei dem Phosphatidylcholin um hochreines Phosphatidylcholin handelt, d.h. um solches Phosphatidylcholin, das weniger als etwa 10 Gew.% Verunreinigungen aufweist, besitzt ein hieraus hergestelltes Liposomensystem, das vorzugsweise als negativer phospholipidischer Ladungsträger das zuvor beschriebene Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz enthält, die eingangs beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften. Hinzu kommt noch, daß ein derartiges

spezielles Liposomensystem mit wesentlich geringerem Aufwand und somit in etwa der halben Zeit durch Hochdruckspalthomogenisation oder Ultraschall auf einen gewünschten mittleren Partikeldurchmesser, der zwischen 50 nm und 180 nm, vorzugsweise zwischen 70 nm und 130 nm, liegt, homogen zerkleinert werden kann. Auch läßt sich ein derartig spezielles Liposomensystem ohne Problem steril filtrieren, wobei hierfür vorzugsweise 0,2 µm Filter eingesetzt werden.

Bezüglich der Phospholipidkonzentration bei dem erfindungsgemäßen Liposomensystem ist festzuhalten, daß diese zwischen 0,5 Gew.% und 20 Gew.% variiert.

Wie bereits eingangs beschrieben, kann auch das erfindungsgemäße Liposomensystem sowohl für pharmazeutische als auch für kosmetische Zwecke eingesetzt werden.

Wird das erfindungsgemäße Liposomensystem für pharmazeutische Zwecke verwendet, so bestehen zwei Möglichkeiten.

Hierbei sieht die erste Möglichkeit vor, daß das erfindungsgemäße Liposomensystem in Form eines Leer-Liposomensystems verwendet wird, d.h. das Liposomensystem als solches weist bereits eine pharmazeutische Wirksamkeit auf. Hier konnte festgestellt werden, daß ein derartiges Leer-Liposomensystem hervorragend zur Behandlung von Atherosklerose, erhöhten Blutfettwerten sowie Hepatopathien jeder Genese einsetzbar ist, wobei ein derartiges System vorzugsweise neben Wasser und ggf. Alkohol zwischen 5 Gew.% und 15 Gew.% einer Mischung von Phosphatidylcholin und negativem Ladungsträger in dem zuvor genannten Massenverhältnis enthält. Insbesondere wird ein derartiges pharmazeutisches Produkt dann bei seiner Anwendung injiziert.

Die zweite Möglichkeit sieht vor, daß in das erfindungsgemäße Liposomensystem ein Wirkstoff eingekapselt wird. Hier hat sich gezeigt, daß ein derartig eingekapselter Wirkstoff im Vergleich zu der bekannten Aufmachungform eine verbesserte therapeutische Wirkung, besitzt, ohne daß hierdurch das Behandlungsziel beeinträchtigt wird. Dieser Effekt wird darauf zurückgeführt, daß die in dem Liposomensystem eingekapselten Wirkstoffe besonders gleichmäßig über einen längeren Zeitraum während der therapeutischen Anwendung abgegeben werden, so daß auch unerwünschte Nebenwirkungen nicht auftreten oder zumindestens erheblich reduziert sind.

Die Auswahl des jeweiligen Wirkstoffes richtet sich dann nach dem jeweiligen Anwendungsgebiet. So können beispielsweise in dem erfindungsgemäßen Liposomensystem Pentamidin, Pentamidin-Salze, insbesondere Pentamidin-Isethionat, und/oder Pentamidin-Derivate gelöst und/oder eingekapselt werden, so daß ein derartiges pharmazeutisches Produkt vorzugsweise zur parenteralen und insbesondere zur pulmonalen Behandlung von Pneumocystis-carinii-Pneumonie, der afrikanischen Schlafkrankheit oder von Kala-Azar eingesetzt wird.

Besonders geeignet ist es jedoch, wenn man den zuvor genannten Wirkstoff nicht von Anfang an bei der Herstellung des Liposomensystems einsetzt, sondern den Wirkstoff erst unmittelbar vor der Anwendung zugibt. Dies kann dadurch geschehen, daß man ein wäßriges Liposomensystem mit dem Wirkstoff als Trockensubstanz vermischt oder ein getrocknetes Liposomensystem zunächst in Wasser dispergiert und dann die Vermischung mit dem Wirkstoff herbeiführt. Ein derartig hergestelltes pharmazeutisches Produkt weist dann eine hohe Transparenz auf. In bestimmten Fällen werden ähnliche Effekte erzielt, indem Leer-Liposomen-Präparationen mit dem Wirkstoff kombiniert werden, ohne daß dabei der Wirkstoff in den Liposomen eingekapselt wird.

Weist hingegen das erfindungsgemäße Liposomensystem als Wirkstoff Doxorubicin x HCl auf, so kann es als entsprechendes pharmazeutisches Produkt zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

Soll hingegen das erfindungsgemäße Liposomensystem zur Behandlung von Viruserkrankungen, insbesondere Viruserkrankungen der Haut, verwendet werden, so bietet es sich hier an, einen entsprechenden viruciden Wirkstoff, vorzugsweise Rosmarinsäure oder Dextransulfat, einzukapseln.

Weiterhin können in dem erfindungsgemäßen Liposomensystem auch die entsprechenden bekannten Wirkstoffe zur Behandlung von Krebs, Aids, Leber- oder Viruserkrankungen eingekapselt oder angelagert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des zuvor beschriebenen Liposomensystems.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposomensystems basiert auf der Grunderkenntnis, daß man zunächst das jeweils eingesetzte Phospholipid, insbesondere das zuvor beschriebene Phosphatidylcholin bzw. hochreine Phosphatidylcholin zusammen mit dem phospholipidischen Ladungsträger, insbesondere dem Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz, in einem organischen Lösungsmittel löst oder dispergiert. Anschließend engt man die Lösung bzw. Dispersion ein und gibt hiernach eine entsprechende Menge Wasser zu, um so das entsprechende Liposomensystem auszubilden.

Vorzugsweise verwendet man bei dem zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren als Lö-

5 Lösungsmittel Ethanol, Propanol 1 und/oder Propanol 2.

Abhängig von dem jeweils eingesetzten nicht toxischen organischen Lösungsmittel und seiner Mischbarkeit bzw. Verträglichkeit mit Wasser engt man die anfangs hergestellte Lösung bzw. Dispersion auf unterschiedliche Restvolumina ein. Werden z.B. als nicht toxische organische Lösungsmittel die zuvor genannten Alkohole eingesetzt, so bietet es sich hier an, die entsprechende Lösung des Phospholipids mit dem negativen phospholipidischen Ladungsträger auf ein Restvolumen zwischen 3 Vol.% und 30 Vol.%, vorzugsweise 5 Vol.% bis 10 Vol.%, einzuengen. Bei solchen organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser nicht mischbar sind, empfiehlt es sich, bis zur Trocknen einzuengen.

Um bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Liposomensystem herzustellen, das sich durch besonders gleichmäßige, gezielt eingestellte mittlere Liposomendurchmesser auszeichnet, bietet es sich an, nach der Zugabe des Wassers das hierbei entstehende Liposomensystem einer Hochdruckspalthomogenisation oder einer Ultraschallbehandlung zu unterwerfen. Vorzugsweise werden diese Behandlungen solange durchgeführt, bis die dabei gebildeten Liposome einen mittleren Durchmesser zwischen 50 nm und 180 nm aufweisen.

15 Zusätzlich hierzu kann man hiernach noch das so behandelte Liposomensystem über einen 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Die so hergestellten Liposomensysteme können dann entweder direkt anwendungsfertig in entsprechende Ampullen abgefüllt werden oder nach Zugabe geeigneter Hilfsstoffe, insbesondere Kohlehydrate, schonend getrocknet, insbesondere gefriergetrocknet, werden, so daß ein pulverartiges Liposomensystem entsteht, das durch Zugabe einer geeigneten Menge Wasser wieder die dann anwendungsbereiten erwünschten Vesikel ausbilden, ohne daß hierbei ein aufwendiges Rühren oder sonstiges Vermischen erforderlich ist.

Um die Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposomensystems, das eine der zuvor genannten Wirkstoffe aufweist, herzustellen, bestehen wiederum zwei Möglichkeiten.

25 So sieht die erste Möglichkeit vor, daß man den Wirkstoff zusammen mit dem Phospholipid und dem phospholipidischen Ladungsträger direkt zu Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens in das organische Lösungsmittel zugibt. Eine Abwandlung dieser Verfahrensvariante sieht vor, daß man das eingesetzte Phospholipid mit dem in einem nicht wäßrigen Lösungsmittel gelösten, dispergierten bzw. emulgierten Wirkstoff belädt, und dann nach schonender Trocknung das so beladene Phospholipid zusammen mit dem 30 phospholipidischen Ladungsträger in einem organischen Lösungsmittel, das ggf. von dem ersten Lösungsmittel unterschiedlich ist, löst. Anschließend wird das organische Lösungsmittel, wie vorstehend beschrieben, eingeeengt und hiernach das Wasser unter Ausbildung des Wirkstoff-Liposomensystem zugegeben, wobei der Wirkstoff dann eingekapselt sein kann. Diese Verfahrensweise bietet sich insbesondere für solche Fälle an, bei denen der Wirkstoff bezüglich seiner Lagerung stabil ist.

35 Die zweite Möglichkeit, die insbesondere dann bevorzugt wird, wenn der Wirkstoff nicht in dem zuerst eingesetzten organischen Lösungsmittel, sondern in Wasser besser löslich ist, sieht vor, daß man zunächst in der vorstehend beschriebenen Weise das wäßrige Liposomensystem herstellt, wobei man dann zusammen mit dem Wasser den Wirkstoff zugibt.

Eine Abwandlung der zuvor beschriebenen Verfahrensweise, die insbesondere dann angewendet wird, 40 wenn der Wirkstoff nur eine begrenzte Haltbarkeit besitzt, geht von einem pulverförmigen getrockneten Liposomensystem aus. Hierbei wird bei der Redispersierung zusammen mit dem dabei eingesetzten Wasser der Wirkstoff zugesetzt, so daß somit erst unmittelbar vor der Anwendung eines derartigen Produktes der Wirkstoff mit dem Liposomensystem in Kontakt kommt.

Um unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen, wird das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise unter Schutzgas (Inertgas) durchgeführt.

45 Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen angegeben.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

50 Beispiel 1

Herstellung eines Leer-Liposomensystems

99,5 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 0,5 g Soja- 55 Phosphatidylglycerol-Natriumsalz (PG) werden in 500 ml Ethanol DAB 9 gelöst und anschließend unter Vakuum zur Trockne gebracht. Das erhaltene Phospholipidgemisch wurde unter Rühren und Inertgas in Wasser für Injektionszwecke ad 1000 ml dispergiert und danach mittels Hochdruckspalthomogenisator in fünf Umläufen auf einen mittleren Partikeldurchmesser von < 100 nm gebracht. Das entstanden Liposo-

mensystem wurde anschließend unter sterilen Bedingungen über ein 0,2 µm Filter filtriert und unter Inertgasung in 10,0 ml Ampullen abgefüllt. Das nach Beispiel 1 hergestellte Phosphatidylcholin/Soja-PG-Natriumsystem Liposomensystem wies folgende Eigenschaften auf:

5	Phospholipidgehalt:	10% (m/V)
	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH:	6,1
10	Viskosität:	2,6 mPa.s
	osmotischer Druck:	0,49 (% NaCl)
	Transmission (660 nm):	75%
	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	75 nm
	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
15	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht Anforderungen des DAB 9
	elektronenmikroskopische Charakterisierung (Kryofixierung):	40-100 nm unilamellare Liposomen, selten bilamellare Liposomen

20 Aufgrund seiner Zusammensetzung kann dieses Produkt in folgenden Anwendungsgebieten verwendet werden: Atherosklerose, erhöhte Blutfettwerte, Hepatopathien jeder Genese.

Beispiel 2

25 500 g Phospholipidmischung, bestehend aus 497,5 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 2,5 g Soja-PG-Natriumsalz, hergestellt nach Beispiel 1, wurden in 6,5 l Wasser für Injektionszwecke unter Rühren und Inertgas dispergiert. Danach wurde mit Wasser für Injektionszwecke auf 8,0 l aufgefüllt. In einem separaten Ansatzgefäß wurden 2 kg Maltose in 1,5 l Wasser für Injektionszwecke unter Erwärmen auf 70° gelöst. Durch mehrere Umläufen in einem Hochdruckspalthomogenisator (APV Gaulin, Typ LAB 60) wurde das Phospholipidsystem auf einen mittleren Partikeldurchmesser von 56 nm gebracht, mit der Maltoselösung unter Rühren und Inertgas gemischt, mit Wasser für Injektionszwecke auf 10,0 l aufgefüllt, sterilfiltriert, unter aseptischen Bedingungen abgefüllt und gefriertrocknet. Das nach der Gefriertrocknung entstandene Lyophilisat wies folgende Merkmale auf:

35	Aussehen:	kristallines, schwach-gelbes Trockenpulver
	Gehalt an Restfeuchte nach Karl Fischer:	< 0,7%
	Gehalt an Phospholipiden:	500 mg/Vial
40	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität nach DAB 9
	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht den Anforderungen des DAB 9

Nach Redispersierung des Lyophilisates mit 8,3 ml Wasser für Injektionszwecke erhielt man ein Liposomensystem mit folgenden Eigenschaften:

45	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH-Wert:	6,5
	Viskosität:	2,7 mPa.s
50	Transmission (660 nm):	72%
	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuungsmethode):	60 nm

Das nach Beispiel 1 gefertigte Phospholipid-Liposomensystem und das nach Beispiel 2 gefertigte Lyophilisat kann für folgende Anwendungszwecke eingesetzt werden: Atherosklerose, erhöhte Blutfettwerte, Hepatopathien jeder Genese. Gegenüber des in Beispiel 1 gefertigten wässrigen Liposomensystems hat das nach Beispiel 2 gefertigte Lyophilisat den Vorteil einer noch größeren Stabilität.

Die nach Beispiel 1 hergestellte Phospholipidmischung, bestehend aus Phosphatidylcholin und Soja-PG-Natriumsalz, kann sowohl zur Herstellung von unbeladenen, sterilfiltrierbaren Phosphatidylcholin-Liposomen-

systemen (Beispiel 1 + 2) als auch für die Herstellung von beladenen sterilen Liposomensystemen (Beispiel 3-5) verwendet werden.

Beispiel 3

10 g des erfindungsgemäßen Phospholipidgemisches wurden entsprechend Beispiel 1 gemeinsam mit 0.1 g Propidiumjodid (DNA-Marker) in Ethanol gelöst und nach Trocknung unter Vakuum, Inertgas und Kühlung in 100 ml Wasser für Injektionszwecke dispergiert. Danach wurde ebenfalls unter Inertbegasung und Kühlung eine Ultraschallbehandlung durchgeführt bis ein mittlerer Partikeldurchmesser der Liposomen von 80 nm (Laserlichtstreuung) erreicht wird. Das Liposomensystem wurde danach über ein 0.2 µm Filter sterilfiltriert und unter Inertbegasung zur Hälfte in braune 1.0 ml Ampullen abgefüllt. In dem sterilen, mit Propidiumjodid beladenen Liposomensystem wurde mittels eines Dialyseverfahrens (Dianorm[®]-Gerät, Zelluloseetriacetatmembran NMGT 20000) der Anteil an liposomalgebundenem Propidiumjodid ermittelt. Danach betrug der liposomalgebundene Propidiumjodidanteil 29%. In der 2. sterilfiltrierten Hälfte wurde der Anteil nicht liposomalgebundenen Propidiumjodids mittels Ultrafiltration über eine Zelluloseetriacetatmembran NMGT 20000 abgetrennt, die Liposomendispersion nochmals über 0.2 µm sterilfiltriert und zu 1.0 ml unter Inertbegasung in braune Ampullen abgefüllt. Die somit erhaltene Liposomendispersion wies folgende Eigenschaften auf:

Phospholipidgehalt:	100 mg/ml
Propidiumjodidgehalt:	0.285 mg/ml
pH-Wert:	7,2
Viskosität:	1,7 mPa.s
mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	129 nm

Beispiel 4

18.4 g der in Beispiel 1 beschriebenen Phospholipidmischung wurden gemeinsam mit 0.92 g Chinolingelb in Ethanol gelöst, unter Vakuum zur Trockne gebracht, mit Wasser für Injektionszwecke ad 200 ml dispergiert und danach unter Kühlung ultraschallbehandelt. Das erhaltene Liposomensystem wurde anschließend sterilfiltriert und unter aseptischen Bedingungen in Injektionsflaschen zu 5.0 ml abgefüllt. Die sterilfiltrierte Liposomendispersion wies folgende Eigenschaften auf:

Aussehen:	transparente, opalisierende gelbe Flüssigkeit
pH-Wert:	6,4
mittl. Partikeldurchmesser (Laserstreulichtmethode):	75 nm
Transmission (660 nm):	33 %
Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
Chinolingelb, liposomalgebunden:	1,38 mg/ml
Chinolingelb, nicht liposomalgebunden:	3,2 mg/ml

Zur Bestimmung des Anteils an liposomalgebundenem Chinolingelb wurde mittels Ultrafiltration über eine Zelluloseetriacetatmembran NMGT 20000 der nicht liposomalgebundenen Chinolingelbanteil abgetrennt und photometrisch in der Liposomendispersion und im Filtrat der Anteil Chinolingelb bestimmt.

Die entsprechend Beispiel 2 in ein steriles Trockenpulver überführte erfindungsgemäße Phospholipidmischung eignet sich auch zur exportierten (ready to use) Herstellung von mit aktiven wasserlöslichen Substanzen beladenen Liposomen.

Beispiel 5

Steriles Trockenpulver, entsprechend 500 mg Phospholipidmischung beschrieben in Beispiel 1, und 2000 mg Trägerstoff wurden mit 5.0 ml Doxorubicin HCl-Lösung (10.0 mg Doxorubicin HCl) dispergiert. Das entstehende und mit Doxorubicin HCl beladene Liposomen-Redispersat (6.8 ml) wies einen Gehalt an Phospholipiden von 73.5 mg/ml und einen GesamtDoxorubicin HCl Gehalt von 0,735 mg/ml auf. Der Anteil an liposomalgebundenem Doxorubicin HCl wurde mit 0,58 mg/ml ermittelt und entspricht einer Einschlußra-

Patentanspruch

1. Wäßriges Liposomensystem, das ggf. neben einem nicht toxischen organischen Lösungsmittel mindestens ein Phospholipid aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß das Liposomensystem neben dem Phospholipid des weiteren mindestens einen phospholipidischen Ladungsträger umfaßt.
2. Liposomensystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als phospholipidischen Ladungsträger mindestens ein Salz, vorzugsweise Natrium- und/oder Ammoniumsalz, von Phosphatidylglycerol und/oder dessen Derivaten aufweist.
3. Liposomensystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Ladungsträger das Salz von Dimyristoylphosphatidylglycerol und/oder Dipalmitoylphosphatidylglycerol aufweist.
4. Liposomensystem nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Phosphatidylglycerol ein Soja-Phosphatidylglycerol ist.
5. Liposomensystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es das Phospholipid zu dem phospholipidischen Ladungsträger in einem Massenverhältnis von 50:1 bis 400:1, vorzugsweise von 100:1 bis 200:1, aufweist.
6. Liposomensystem nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zwischen 0,5 Gew.% und 20 Gew.% Phospholipid enthält.
7. Liposomensystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Phospholipid Phosphatidylcholin enthält.
8. Liposomensystem nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Phosphatidylcholin ein hochreines Phosphatidylcholin ist und weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen aufweist.
9. Liposomensystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine pharmazeutisch wirksame Substanz beinhaltet.
10. Liposomensystem nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame Substanz ein Wirkstoff zur Behandlung von Krebs, Aids, Leber-, Viruserkrankungen oder Pneumocystis-carinii-Pneumonie ist.
11. Verfahren zur Herstellung eines Liposomensystems nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst das Phospholipid zusammen mit dem phospholipidischen Ladungsträger in einem organischen Lösungsmittel löst oder dispergiert, anschließend die Lösung bzw. Dispersion einengt und hiernach Wasser unter Ausbildung des Liposomensystems zugibt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als organisches Lösungsmittel Ethanol, Propanol 1 und/oder Propanol 2 verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lösung bzw. Dispersion auf ein Restvolumen an Lösungsmittel von 0 Vol.% bis 30 Vol.%, vorzugsweise 5 Vol.% bis 10 Vol.%, einengt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Zugabe des Wassers das hierbei entstehende Liposomensystem einer Hochdruckspalthomogenisation oder einer Ultraschallbehandlung unterwirft.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man die Hochdruckspalthomogenisation bzw. die Ultraschallbehandlung solange durchführt, bis die dabei gebildeten Liposome einen mittleren Durchmesser zwischen 50 nm und 180 nm aufweisen.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man das Liposomensystem über einen 0,2 µm Filter filtriert.

te von ca. 78%.

Die Ermittlung des liposomalgebundenen Doxorubicin HCl Anteils erfolgte nach der Dialysemethode mittels Liposomaten. Einsatz 5,0 ml, Dauer 5 Std.

5 Beispiel 6

Herstellung eines Leer-Liposomensystems

100 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 0,502 g Soja-
 10 Phosphatidylglycerol-Natriumsalz (PG) werden in 500 ml Ethanol DAB 9 gelöst und anschließend unter
 Vakuum auf einen Trockensubstanzgehalt von 92 Gew.% eingestellt. Das erhaltene Phospholipidgemisch,
 bestehend aus 91,54 Gew.% Phosphatidylcholin, 0,46 Gew.% Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz, 6
 Gew.% Ethanol und 2 Gew.% Wasser, wurde unter Rühren und Inertgas in Wasser für Injektionszwecke ad
 1000 ml dispergiert und danach mittels Hochdruckspalthomogenisator in fünf Umläufen auf einen mittleren
 15 Partikeldurchmesser von < 100 nm gebracht. Das entstandene Liposomensystem wurde anschließend unter
 sterilen Bedingungen über ein 0,2 µm Filter filtriert und unter Inertbegasung in 10,0 ml Ampullen abgefüllt.
 Das nach Beispiel 6 hergestellte Phosphatidylcholin/Soja-PG-Natriumsystem Liposomensystem wies folgen-
 de Eigenschaften auf:

20	Phosphatidylcholingehalt:	10% (m/V)
	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH:	6,1
	Viskosität:	2,6 mPa.s
25	osmotischer Druck:	0,49 (% NaCl)
	Transmission (660 nm):	75%
	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	75 nm
	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht den Anforderungen des DAB 9

30 Aufgrund seiner Zusammensetzung kann dieses Produkt in folgenden Anwendungsgebieten verwendet werden: Atherosklerose, erhöhte Blutfettwerte, Hepatopathien jeder Genese.

35 Beispiel 7

Herstellung eines Leer-Liposomensystems

100 g Phosphatidylcholin hochrein, d.h. weniger als 10 Gew.% Verunreinigungen, und 0,502 g Soja-
 Phosphatidylglycerol-Natriumsalz (PG) werden in 500 ml Ethanol DAB 9 gelöst und anschließend unter
 40 Vakuum auf einen Trockensubstanzgehalt von 92 Gew.% eingestellt. Das erhaltene Phospholipidgemisch,
 bestehend aus 91,54 Gew.% Phosphatidylcholin, 0,46 Gew.% Soja-Phosphatidylglycerol-Natriumsalz, 6
 Gew.% Ethanol und 2 Gew.% Wasser, wurde unter Rühren und Inertgas in Wasser für Injektionszwecke ad
 8333 ml dispergiert und danach mittels Hochdruckspalthomogenisator bei 500 bar in fünf Umläufen auf
 einen mittleren Partikeldurchmesser von < 100 nm gebracht. Das entstandene Liposomensystem wurde
 45 anschließend unter sterilen Bedingungen über ein 0,2 µm Filter filtriert und unter Inertbegasung in 10,0 ml
 Ampullen abgefüllt. Das nach Beispiel 7 hergestellte Phosphatidylcholin/Soja-PG-Natriumsystem Liposo-
 mensystem wies folgende Eigenschaften auf:

50	Phosphatidylcholingehalt:	1,2% (m/V)
	Aussehen:	transparente, leicht opalisierende Flüssigkeit
	pH:	6,19
	Viskosität:	1,4 mPa.s
	Transmission (660 nm):	82%
55	mittl. Partikeldurchmesser (Laserlichtstreuung):	58 nm
	Sterilität:	entspricht der Prüfung auf Sterilität, DAB 9
	Endotoxingehalt (Limulustest):	entspricht den Anforderungen des DAB 9



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 11 2377

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE					
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. C.I.S.)		
X	US-A-4 744 989 (PAYNE ET AL.) - - -	1,5-11,18	A 61 K 9/127		
X Y	US-A-4 744 989 (* Spalte 12, Zeile 36 - Spalte 13, Zeile 9 *) - - -	1,5-11,18 2-4, 12-17,19			
Y	EP-A-0 274 174 (YISSUM RESEARCH AND DEVELOPMENTCOMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF J) * Seite 15 - Seite 16; Beispiel 1 ** - - -	2-4,13,19			
X	US-A-4 348 384 (HORIKOSHI ET AL.) * Spalte 8 - Spalte 9; Beispiel 6 ** - - -	1			
X	EP-A-0 331 635 (THE BOARD OF REGENTS UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) - - -	1,2			
Y	DE-A-3 301 951 (A. NATTERMANN & CIE GMBH) * Seite 11 - Seite 14 ** - - -	12,14-17, 19,12, 14-17,19			
D.A	EP-A-0 315 467 (LYPHOMED, INC) - - - - -	10	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. C.I.S.) A 61 K		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt					
Rechenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 14 November 91	Prüfer BENZ K.F.		
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie - : übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie - : übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie - : übereinstimmendes Dokument				

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man das durch die Zugabe des Wassers gebildete Liposomensystem nach Zugabe eines geeigneten Hilfsstoffes, insbesondere eines Kohlehydrates, schonend trocknet, insbesondere gefriertrocknet.
- 5 18. Verfahren zur Herstellung eines mit einem Wirkstoff versehenen Liposomensystems nach einem der Ansprüche 9 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man den Wirkstoff zusammen mit dem Phospholipid und dem phospholipidischen Ladungsträger in dem organischen Lösungsmittel löst, emulgiert oder dispergiert.
- 10 19. Verfahren zur Herstellung eines mit einem Wirkstoff versehenen Liposomensystems nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man das getrocknete Liposomensystem in Wasser, dem mindestens eine pharmazeutisch wirksame Substanz zugesetzt ist, aufnimmt.

15

20

25

30

35

40

45

50

55